



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 28 210.2

Anmeldetag: 19. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: Horst P e s c h e l,
Gummersbach/DE

Bezeichnung: Neuronales Zellmaterial, Verwendung als
Transplantat und Verfahren zu dessen Her-
stellung

IPC: C 12 N 5/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 27. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

18. Juni 1999

5

Horst Peschel**51643 Gummersbach**

10 **Neuronales Zellmaterial, Verwendung als Transplantat und
Verfahren zu dessen Herstellung**

15 Die Erfindung betrifft ein neuronales Zellmaterial, dessen
Verwendung als Transplantat in der Neurologie bzw. Neurochir-
urgie sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

20 Für die Behandlung bestimmter Erkrankungen des Nervensystems
wird das Konzept verfolgt, diese Krankheiten durch die Trans-
plantation geeigneter Zellkulturen zu therapieren. Dieser
Therapie liegt die Erkenntnis zugrunde, daß bestimmte Krank-
heiten Funktionsstörungen oder dem Absterben bestimmter Typen
von Nervenzellen zuzuordnen sind. So besteht die Möglichkeit,
Morbus Parkinson durch Transplantation dopaminergener Neuronen
zu therapieren, Morbus Alzheimer durch Transplantation choli-
nerger Neuronen, Chorea Huntington durch Transplantation
25 striataler Neuronen sowie MSA durch Transplantation striataler
und dopaminergener Neuronen.

30 Problematisch bei diesem Therapieansatz ist zur Zeit, daß die
entsprechenden Transplantate nicht in ausreichendem Umfang zur
Verfügung stehen, da diese zumeist aus fetalem Gewebe gewonnen
werden.

35 Ein weiteres Problem liegt in möglichen Abstoßungsreaktionen,
da verschiedene Zelltypen in dem Transplantat vorhanden sind,
die eine Gewebeabstoßung als Immunantwort auslösen können.
Daher ist zumeist eine Immunsuppression durch geeignete Arz-
neimittel notwendig, die jedoch unerwünschte Nebenwirkungen

haben können.

Darüber hinaus besteht das Problem, daß die auf bisher bekanntem Wege präparierten Zellen bereits nach wenigen Tagen transplantiert werden müssen, wodurch die Möglichkeiten einer infektiologischen Untersuchung z.B. bezüglich Aids- oder Hepatitis-Viren beschränkt sind.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neuronales Zellmaterial zur Verfügung zu stellen, das zur Transplantation geeignet ist oder aus dem Transplantate gewonnen werden können, welches die oben genannten Nachteile nicht aufweist. Des weiteren liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines derartigen Zellmaterials bzw. derartiger Transplantate bereitzustellen.

Die Aufgabe wird durch die Merkmale der unabhängigen Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind den Unteransprüchen zu entnehmen.

Die Erfindung basiert auf dem Konzept, Progenitorzellen in Kultur zu halten und zu vermehren. Nach ausreichender Expansion können diese Zellen dann durch Einwirkung geeigneter Wirkstoffe, insbesondere Eiweiße, sekundär in spezifische Neuronen (z.B. dopaminerge Neuronen) differenziert werden. Durch diese Differenzierung können Zellkulturen erhalten werden, die praktisch ausschließlich aus den gewünschten neuronalen Zellen bestehen und insbesondere immunkompetente gliale Zellen nur noch in Anteilen enthalten, die keine physiologische Wirkung mehr haben, insbesondere nicht mehr nachweisbar sind. Hierdurch können geeignete und bezüglich der vorhandenen Zelltypen besser definierte Transplantate in praktisch unbegrenztem Ausmaß hergestellt werden.

So kann Zellmaterial erhalten werden, das praktisch ausschließlich dopaminerge Neuronen und/oder cholinerge Neuronen und/oder GABAerge striatale und/oder serotoninerge Neuronen einzeln oder in Kombinationen enthält, d.h. der Anteil der

genannten Neuronen an dem Zellmaterial beträgt größer 90%, vorzugsweise größer 95% bzw. enthält keine physiologisch wirksamen Anteile anderer Zellen, insbesondere glialer Zellen.

- 5 Die Progenitorzellen, durch deren Vermehrung, Selektion und Differenzierung Zellkulturen bzw. transplantationsfähiges Zellmaterial gewonnen wird, können sowohl aus fetalem als auch aus adultem neuronalem Zellmaterial (Gehirn oder Rückenmark) gewonnen werden. Das adulte Zellmaterial wird vorteilhafterweise aus periventrikulären Abschnitten präpariert.

Der Entnahmeort der fetalen Zellen kann sich nach dem Zielgewebe richten, d.h. Progenitorzellen werden aus den Arealen entnommen, in denen die gewünschten Neuronen später vorkommen, z.B. dopaminerge Neuronen aus Mittelhirngewebe. Es können bei geeigneter Differenzierung mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens jedoch insbesondere auch verschiedene Progenitorzellen aus Gewebe ein- und derselben Entnahmestelle gewonnen werden, z.B. auch aus Stammzellen des Blutes aus Nabelschnurgewebe.

20 Vorteilhafterweise werden die neuronalen Zellen aus Föten mit einem Alter von 3 bis 25 Wochen, vorzugsweise 5 bis 11 Wochen, nach der Befruchtung präpariert.

25 Die Isolierung und Kultivierung von neuronalen Progenitorzellen aus dem Nagetierhirn ist mehrfach beschrieben worden (Daadi und Weiss, J. Neurosci 1999; Magrassi et al., Development 1998; 54:107-115; Ptak et al., Cell Transplant 1995; 4:299-310; Liepelt et al., Brain Res Dev Brain Res 1990; 30 51:267-278). Die Autoren konnten Progenitorzellen aus verschiedenen Arealen im Gehirn präparieren. Des weiteren wurden humane Progenitorzellen aus fetalem kortikalem Gewebe (bzw. dem gesamten Gehirn) präpariert (Buc-Caron, Neurobiol Dis 1995; 2:37-47; Svandsen CN et al., Exp Neurol 1997; 148:135-35 146; Sah et al., Nat Biotechnol 1997; 15:574-580; Chalmers-Redman et al., Neuroscience 1997; 76:1121-1128). Bezüglich der Art und Weise der Präparation der Progenitorzellen wird auf die oben genannten Druckschriften hiermit vollinhaltlich Bezug

genommen.

Die Bereitstellung von transplantationsfähigem neuronalem Zellmaterial erfolgt gemäß der Erfindung durch ein Verfahren, daß eine Expansion der mittelbar oder unmittelbar gewonnen humanen Progenitorzellen, eine partielle in vitro Differenzierung und eine Selektionierung umfaßt, wobei die letztlich erhaltenen neuronalen Kulturen ohne Zugabe weiterer Faktoren oder genetischer Manipulationen mit hohem Prozentsatz in den gewünschten Zelltyp ausdifferenziert werden können oder nach Transplantation ausdifferenzieren.

Gegebenenfalls kann nach einem Differenzierungs- oder Selektionierungsschritt der Progenitorzellen eine erneute Expansion des Zellmaterials erfolgen.

Die oben angegebenen Schritte der Differenzierung und Selektionierung können mehrmals wiederholt werden, wobei die Art und Weise der Durchführung sich jeweils unterscheiden kann.

Durch die Erfindung ist es insgesamt möglich semiunreife neuronale Progenitorzellen soweit zu selektionieren und differenzieren, daß nach Zugabe von Nährmedien bzw. nach Transplantation überwiegend ein spezifischer Zelltyp ausdifferenziert.

Die Expansion kann insbesondere durch die Prozesse der Hypoxie, Priming, gegebenenfalls unter vermindertem Sauerstoffgehalt der Atmosphäre, transiente oder nichttransiente genetische Manipulation und/oder Behandlung mit exogenen Faktoren, insbesondere unter vermindertem Sauerstoffgehalt der Atmosphäre, erfolgen. Die Verfahrensschritte werden später detaillierter beschrieben.

Die Selektionierung kann durch Subklonierung erfolgen, insbesondere durch Subklonierung unter Hypoxie.

Das Verfahren kann insbesondere so ausgeführt werden, daß nach der Expansion der frisch gewonnen Progenitorzellen eine selek-

tive Expansion des gewünschten Zelltyps vorgenommen wird. Die
 selektive Expansion kann durch Veränderung des Sauerstoff-
 gehaltes, die Applikation geeigneter Mitogene oder eine par-
 tielle Differenzierung (Priming) mittels exogener Faktoren,
 5 wahlweise jeweils unter vermindertem Sauerstoffgehalt der
 Atmosphäre, erfolgen. Die Selektionierung der "determinierten"
 Progenitoren kann durch Subklonierung erfolgen, wahlweise
 unter vermindertem Sauerstoffgehalt der Atmosphäre. Der Sub-
 klonierung kann eine erneute Expansion und ggf. eine erneute
 10 partielle Differenzierung durch eine der oben angegebene Me-
 thoden (Hypoxie, Priming, bzw. Behandlung mit exogenen Fakto-
 ren), insbesondere durch Behandlung mit exogenen Faktoren oder
 durch Priming, wahlweise jeweils unter vermindertem Sauer-
 stoffgehalt der Atmosphäre. Die erste oder zweite Differenzie-
 15 rung kann auch durch eine transiente oder nichttransiente
 genetische Manipulation erfolgen bzw. unterstützt werden.
 Alternativ zu einer Verminderung des Sauerstoffgehaltes können
 die Verfahrensschritte auch unter Bedingungen durchgeführt
 werden, die Veränderungen simulieren, die durch diesen ver-
 änderten Sauerstoffgehalt induziert werden.
 20

Die Expansion kann jeweils ausgehend von einer monoklonalen
 Progenitorzelllinie erfolgen.

25 Der Erfolg der Differenzierung (in vitro oder in vivo), d. h.
 die Charakterisierung der erhaltenen Neuronenpopulationen
 erfolgt vorteilhafterweise mit biochemischen, molekularbiolo-
 gischen, immunhistochemischen und elektrophysiologischen Metho-
 den. Diese sind für die verschiedenen Neuronenpopulationen der
 30 einschlägigen Fachliteratur zu entnehmen.

Expansion unter hypoxischen Bedingungen:

Es hat sich herausgestellt, daß eine erhebliche Verbesserung
 der Teilungsrate durch eine Absenkung des Luftsauerstoffge-
 35 halts erzielt werden kann, wobei hierdurch zugleich die Antei-
 le spezieller neuronaler Progenitorzellen, insbesondere der
 dopaminergen Neuronen, erhöht werden, also eine Differenzie-
 rung erfolgt. Beispielfhaft sei hier eine Erniedrigung der

Sauerstoffspannung von 21 % (Raumluft) auf 10%, vorzugsweise 5%, besonders bevorzugt 1 % genannt. Die Absenkung des Luft-sauerstoffgehalts erfolgt unter Bedingungen, unter denen sich das Zellmaterial vermehrt. Durch diese Technik der Kultivierung können humane Progenitorzelllinien auch aus den verschiedenen Hirnarealen (auch Mittelhirngewebe) etabliert werden.

Bei der Expansion eingesetzte exogene Faktoren (siehe unten) können einzeln oder in Kombination jeweils in Konzentrationen von 4000 bis 0,01 ng/ml, vorzugsweise 500 bis 1 ng/ml, besonders bevorzugt 100 bis 2 ng/ml der Expansionslösung vorliegen, ohne hierauf beschränkt zu sein.

Partielle Differenzierung durch Priming:

Priming bedeutet, daß die (monoklonalen) neuronalen Progenitorzellen mit einem Wachstumsfaktor, Zytokinen, Neurotransmitter und/oder der einem anderen Wirkstoff, insbesondere einen oder mehrere der unten genannten, behandelt werden, der/die die Differenzierung in die gewünschte Nervenzellpopulation begünstigt. Zu diesem Zweck können auch sogenannte konditionierte Medien eingesetzt werden, d.h. Kulturmedien, die zur Kultivierung insbesondere der Neuronen des Zielgebietes der gewünschten Nervenzellenpopulation (z.B. Striatum bei dopaminergen Neuronen) oder Glialzellen verwendet werden. Diese Medien enthalten die Eiweiße, die von den jeweiligen Zellen sezerniert wurden. Diese exogener Faktoren werden dann zu einem Zeitpunkt wieder entzogen, zu welchem die Zellen wieder in einen Zustand entdifferenzieren, in dem die weitere Expansion möglich ist. Derart rückumgewandelte Progenitorzellen werden als geprimte Zellen bezeichnet. Bei einer zweiten Exposition mit wirksamen endogenen Faktoren (z.B. nach Transplantation in ein adultes Gehirn) kommt es dann zu einer vielfach schnelleren Differenzierung. Bei (erneuter) Expansion werden dann geprimte monoklonale Zelllinien gewonnen, die bereits Gene exprimieren, die eine höhere Spezifität gewährleisten. Dieser Schritt kann beliebig oft wiederholt werden, wobei die Zellen jeweils anderen Faktoren oder den gleichen Faktoren in anderen Konzentrationen ausgesetzt werden können.

Differenzierung durch Transfektion:

Insbesondere im Rahmen des oben beschriebenen Primings können auch genetische Manipulationen eingesetzt werden. Durch die Transfektion der Progenitorzellen mit Genen, die in der Entwicklung der spezifischen Neuronen relevant sind, wird eine Differenzierung in den gewünschten Zelltyp begünstigt. Auch eine vorübergehende Expression dieser Gene, welche das Erbmaterial der Zellen nicht verändert und keine Fremdgene nach der Transplantation in das Wirtsgehirn einschleust, determiniert das weitere Schicksal.

Die Entwicklung von dopaminergen Neuronen kann insbesondere durch Transfektion von Genen gesteuert werden, die Mitglieder der Steroid- und Thyroid-Hormon-Rezeptor-Familie wie Tyrosinhydroxylase, Nurr-1 und Nur77 Rezeptoren kodieren. Insbesondere können auch Gene des vesikulären Monoamintransporters oder des Dopamintransporters eingesetzt werden. Generell können Gene verwendet werden, die für dopaminerge Neuronen spezifisch sind.

Zur Selektion cholinergischer Neuronen können für diese Neuronen spezifische Gene transferiert werden, insbesondere Gene des nikotinergen Acetylcholinrezeptors, insbesondere präsynaptische α - und β -Untereinheiten, insbesondere α -7, Gene des Nervenwachstumsfaktor (NGF)-Rezeptors oder der Cholinesterase.

Für striatale Neuronen sind vor allem γ -Aminobuttersäure (GABA)-Transporter kodierende Gene, Dopaminrezeptor kodierende Gene, Glutamatrezeptor kodierende Gene, Enkephalin oder Substanz P kodierende Gene von Bedeutung.

Die entsprechenden cDNA's mit den oben genannten Genen, sind aus der Literatur bekannt und verfügbar. Die Transfektion erfolgt mit den in der Literatur angegebenen Standardverfahren. So ist eine transiente oder stabile Transfektion der Progenitorzellen möglich.

Differenzierung durch Behandlung mit exogenen Faktoren:

Eine Differenzierung der Progenitorzellen kann insbesondere durch eine Behandlung mit geeigneten Zytokinen und/oder Wachstumsfaktoren und/oder Transkriptionsfaktoren und/oder Neurotransmittern und/oder Hormonen und/oder Gangliosiden, insbesondere jeweils aus den nachfolgend genannten Gruppen, erfolgen. Zusätzlich können auch sogenannte konditionierte Medien eingesetzt werden (siehe oben).

Insbesondere können jeweils Kombinationen, insbesondere der unten genannten, Zytokine und Wachstumsfaktoren, Zytokine und Transkriptionsfaktoren, Zytokine und Neurotransmittern, Zytokine und Hormone, Zytokine und Gangliosiden, Zytokine und konditionierte Medien, Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Hormone, Wachstumsfaktoren und Gangliosiden, Wachstumsfaktoren und konditionierte Medien, Transkriptionsfaktoren und Neurotransmittern, Transkriptionsfaktoren und Hormone, Transkriptionsfaktoren und Ganglioside, Transkriptionsfaktoren und konditionierte Medien, Neurotransmitter und Hormone, Neurotransmitter und Gangliosiden, Neurotransmitter und konditionierte Medien verwendet werden.

Insbesondere können auch Kombinationen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zusammen mit Transkriptionsfaktoren oder Neurotransmittern oder Hormonen oder Ganglioside oder konditionierten Medien eingesetzt werden. Es können auch Kombinationen von Zytokinen und Transkriptionsfaktoren zusammen mit Neurotransmittern oder Hormonen oder Ganglioside oder konditionierten Medien eingesetzt werden. Es können auch Kombinationen von Zytokinen und Neurotransmitter zusammen mit Hormonen oder Gangliosiden oder konditionierten Medien eingesetzt werden. Es können auch Kombinationen von Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren zusammen mit Neurotransmittern oder Hormonen oder Gangliosiden oder konditionierten Medien eingesetzt werden. Es können auch Kombinationen von Wachstumsfaktoren und Neurotransmittern zusammen mit Hormonen oder Ganglioside oder konditionierten Medien eingesetzt werden. Es können auch Kombinationen von Wachstumsfaktoren und Hormonen

zusammen mit Ganglioside oder konditionierten Medien eingesetzt werden. Es können auch Kombinationen von Wachstumsfaktoren und Gangliosiden zusammen mit konditionierten Medien eingesetzt werden.

5

Als Wachstumsfaktoren werden einer oder mehrere aus der Gruppe epidermal growth factor (EGF), insbesondere EGF1, EGF2, EGF3 mit den Subgruppen α und β , transforming growth factor (TGF) α und β , LIN-3-Protein, fibroblast growth factor (FGF), FGF1 und FGF2, nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophine (NT), insbesondere NT-3, NT-4, NT-5, NT-6, ciliary neurotrophic factor (CNTF), insulin-like growth factors (IGF), insbesondere IGF-1 und IGF-2, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), Neurturin (NTN), Persephin (PSP), vascular endothelial growth factor (VEGF), leukemia inhibitory factor (LIF), einschließlich deren Untergruppen oder Faktoren ähnlicher Wirkung verwendet.

20

Als Zytokine werden einer oder mehrere aus der Gruppe Interleukine (IL 1-16), tumor necrosis faktor (TNF), insbesondere TNF- α , Interferone (IFN), insbesondere IFN- α , makrophage inhibitor stimulating factors, insbesondere macrophage migration inhibitory factor (MIF), mitochondrial import stimulation factor (MSF) und Retinsäure eingesetzt.

25

Als Neurotransmitter werden einer oder mehrere aus der Gruppe Dopamin, Acetylcholin, GABA, Glutamat, Glycin, Taurin, Prolin, Noradrenalin, Serotonin und Neuropeptide, insbesondere Substanz P und Enkephalin, eingesetzt.

30

Die Neurotransmitter werden allein oder in Gegenwart von Wachstumsfaktoren und/oder Zytokinen eingesetzt werden.

35

Einzelnen oder in Kombination mit den oben genannten Stoffen oder Stoffkombinationen können Hormone wie Wachstumshormone, Schilddrüsenhormone (insbesondere zur Differenzierung der Progenitorzellen zu dopaminergen Neuronen), Steroidhormone oder Ganglioside, jeweils einschließlich deren Derivate, ein-

gesetzt werden.

5 Zur Erzeugung von dopaminergen Neuronen können insbesondere GDNF, LIF und eine oder mehrere von IL1-11 einzeln oder in Kombination eingesetzt werden, insbesondere die Kombination IL-1, GDNF, LIF, IL-11, jeweils einschließlich deren Untergruppen.

10 Generell können bei einem zweiten Differenzierungsschritt mit Hilfe exogener Faktoren diese in anderen Konzentrationen eingesetzt werden oder andere Kombinationen der Faktoren verwendet werden, als beim ersten Differenzierungsschritt.

15 Die exogenen Faktoren können einzeln oder in Kombination jeweils in Konzentrationen von 25,000 bis 0,005 ng/ml, vorzugsweise 1000 bis 0,1 ng/ml, besonders bevorzugt 100 bis 1 ng/ml Expansionslösung eingesetzt werden, ohne hierauf beschränkt zu sein.

20 Insbesondere können zur Differenzierung jeweils IL-1 in Konzentrationen von 0,005 bis 10 ng/ml, vorzugsweise 0,01 bis 2 ng/ml, besonders bevorzugt 0,05 bis 0,25 ng/ml eingesetzt werden. IL-11 und LIF können in Konzentrationen von 0,01 bis 100 ng/ml, vorzugsweise 0,1 bis 20 ng/ml, besonders bevorzugt 0,5 bis 2,5 ng/ml eingesetzt werden. GDNF kann in Konzentrationen von 1 bis 25.000 ng/ml, vorzugsweise 10 bis 5000 ng/ml, besonders bevorzugt 100 bis 2.500 ng/ml eingesetzt werden.

30 Die Faktoren können auch in Kombination in diesen Konzentrationen eingesetzt werden. Die einzusetzenden Konzentrationen sind jedoch nicht auf die oben genannten Werte beschränkt und können unter anderem können in Abhängigkeit von den jeweils anderen eingesetzten Faktoren variieren.

35 Selektionierung durch Subklonierung:

Für die Selektionierung ist insbesondere die Subklonierung geeignet. Mittels Subklonierung lassen sich aus heterogenen Zellkulturen (in diesem Fall die gewonnenen neuronalen Proge-

nitorzellen) Zelllinien generieren, die aus einer einzelnen dieser Progenitorzellen entstanden sind. Somit kann ohne Zugabe exogener Faktoren die Heterogenität dieser Zellen minimiert werden.

5

Die Subklonierung der Progenitorzellen erfolgt durch Endverdünnung der Zellsuspension, so daß lediglich eine Zelle in jedem Kulturgefäß verbleibt. Die so ausplattierten Zellen werden expandiert, wodurch man monoklonale Zelllinien erhält.

10

Dabei werden die Medien vorzugsweise mit mitogenen Substanzen versetzt (siehe oben angegebene Wachstumsfaktoren), um eine Vermehrung aus einer Einzelzelle zu erreichen.

15

Hierbei sollen die Zellen in einem Stadium subkloniert werden, in dem eine möglichst weitgehende Differenzierung erfolgt ist, ohne daß die Teilungsfähigkeit der Zellen gemindert wird, also nach einem Priming, genetischer Manipulation, Veränderung der Atmosphäre oder Behandlung mit exogenen Faktoren.

20

Die oben beschriebenen Schritte der partiellen Differenzierung, Selektionierung und Expansion können bei Bedarf kombiniert und wiederholt angewandt werden.

Allgemeine Verfahrensdurchführung

25

Nach der Präparation des Hirngewebes erfolgt die Homogenisierung. Vorteilhafterweise wird das Gewebe mit einem proteolytisch wirkendem Enzym, insbesondere einer Serin-Protease wie Trypsin, vorzugsweise in einer Konzentration von 100 bis 500 mg versetzt, um den Gewebeverband zu lockern.

30

Anschließend wird das so präparierte Gewebe vorteilhafterweise mit einer DNase-Lösung versetzt, die vorzugsweise eine Konzentration von 0,5 bis 20 mg, vorzugsweise 2 bis 6 mg DNase auf 100 ml Lösung enthält. Vorzugsweise wird DNase I eingesetzt.

35

Die DNase-Lösung wird für 2 bis 30 Minuten, vorzugsweise ca. 10 Minuten inkubiert, um extrazelluläre DNA zu verdauen, da diese das Zellüberleben und die Homogenisierung beeinträchtigen kann.

Anschließend werden die angedauten Gewebeteile durch mehrmaliges Aufziehen in eine Glas-Pasteupipette homogenisiert.

5 Anschließend wird das Gewebe mit einer wirksamen Menge eines Expansionsmediums zur Vermehrung der Progenitorzellen versetzt und in Kulturflaschen expandiert, wie dies aus der angegebenen Literatur bekannt ist.

10 Das Expansionsmedium kann neben den expansionsfördernden (mitogenen) Faktoren 10 bis 60 %, vorzugsweise 30 bis 45% F-12 Medium, 30 bis 75 %, vorzugsweise 45 bis 70% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; glucosefrei oder mit geringen oder hohen Glucosegehalt), wirksame Mengen eines geeigneten Antibiotikums, wie z.B. Penicillin oder Streptomycin, in einer
15 Konzentration von 50 bis 250 I. E./ml für Penicillin und 50 bis 250 µg/ml für Streptomycin, vorzugsweise 150 I. E./ml für Penicillin und 150 µg/ml für Streptomycin enthalten.

20 Die Expansionsmedien können des weiteren ein oder mehrere Substanzen aus der Gruppe Transferrin, biogene Amine, insbesondere Diamine wie z.B. 1,4-Diaminbutan (Putrescin), bakterizidwirkende Reduktionsmittel wie Natriumselenit, Gestagene, insbesondere Progestativa wie Progesteron oder progesteronartige Wirkstoffe, sowie Insulin enthalten. Alternativ können ver-
25 schiedene Supplemente, die aus Serum extrahiert werden, wie z.B. das kommerziell erhältliche B-27 Supplement (Firma Gibco), verwandt werden.

30 Die Expansion kann in veränderter Atmosphäre mit reduziertem Luftsauerstoffgehalt durchgeführt werden. Hierzu werden die Zellen in einer entsprechenden Kammer gelagert, in der eine exakte Sauerstoffkonzentration gewährleistet ist. Je nach gewünschtem Zelltyp wird der Sauerstoffgehalt zwischen 1 % und 10 % variiert.

35 Nach Expansion der Progenitorzellen für 2 bis 10 Wochen, vorzugsweise 6 bis 8 Wochen, unter oben angegebenen Bedingungen erfolgt die Subklonierung der Zellen wie in der oben angebe-

nen Literatur beschrieben. Hierzu werden die Zellsuspensionen seriell verdünnt, bis lediglich 1 Zelle pro Kulturgefäß verbleibt (Endverdünnung), wodurch man monoklonale Zelllinien der heterogenen Progenitorpopulation erhalten kann.

Für die hier zu klonierenden Zellkulturen können insbesondere mitogene Faktoren dem Medium zugesetzt werden. Dazu werden vorteilhafterweise oben genannte Faktoren verwandt. Auch die Subklonierung erfolgt vorzugsweise unter geänderter Atmosphäre. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die Sauerstoffkonzentration sehr individuell auf die isolierten Zellen einzustellen, insbesondere auf Werte zwischen 1 % und 15 %.

Nach ausreichender Expansion der Zellklone erfolgt die Differenzierung der Zellen zu transplantationsfähigen Zellkulturen.

Die Erfindung sei nachfolgend beispielhaft beschrieben.

Ausführungsbeispiel

Zur Gewinnung von Progenitorzellen zur Herstellung humaner neuronaler Zellen eines bestimmten Typs bzw. eines entsprechenden transplantationsfähigen neuronalen Zellmaterials wird das Gehirn eines humanen, fünf bis elf Wochen alten Fötus verwendet, dessen Hirnhäute entfernt wurden. Die Präparation der Gehirnsubstanz erfolgt unter Kühlung, beispielsweise in einer Petriglasschale auf Eis. Die Hirnanteile, aus denen die Progenitorzellen gewonnen werden sollen, werden mit zwei Skalpelln präpariert, wobei die periventrikulären Abschnitte mit präpariert werden. Die präparierten Gehirnteile werden in sterilen Plastikröhrchen mit 12 bis 14 ml einer Dissektionslösung auf Eis überführt.

Die Dissektionslösung enthält 98 % calcium- und magnesiumfreies Hank's buffered salt solution (HBSS), 150 I. E./ml Penicillin/150 µg/ml Streptomycin sowie 4500 mg/l D-Glucose.

Zur Expansion der neuronalen Progenitorzellen wird die das neuronale Zellmaterial enthaltende Dissektionslösung zentrifu-

giert und der Überstand abgesaugt. Das separierte Gewebe mit 1 ml Trypsinlösung (250 mg Trypsin in 100 ml HBSS, steril filtriert und zur Lagerung in 1 ml-Proben bei - 20° C eingefroren) versetzt und aufgeschüttelt. Die Lösung wird für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Probe wird anschließend zentrifugiert und der Überstand von dem Gewebe abgesaugt.

Anschließend wird das so erhaltene Pellet DNase-Lösung (4 mg DNase I, 15 mg Sojabohnen Trypsin Inhibitor, 188.2 mg MgSO₄ auf 100 ml HBSS, steril filtriert und zur Lagerung in 2 ml-Proben bei -20° C eingefroren) versetzt und aufgeschüttelt.

Die Lösung wird für zehn Minuten bei 37° C inkubiert, anschließend zentrifugiert und der Überstand von dem Gewebe abgesaugt.

Das Gewebe wird anschließend mit 3 bis 5 ml Expansionsmedium I oder Expansionsmedium II zur Zellvermehrung versetzt.

Das Expansionsmedium I besteht aus 32 % F-12 Medium, 65 % Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (4500 mg/l D-Glukose), 2 % B-27 Ergänzungslösung (Firma Gibco), 150 I. E./ml Penicillin/150 µg/ml Streptomycin sowie den Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml), wahlweise auch EGF (20 ng/ml) und FGF 2 (20 ng/ml).

Das Expansionsmedium II enthält 45.1 % F-12 Medium, 45.1 % DMEM, 1 ml Transferrin-Stammlösung (100 mg Transferrin auf 10 ml HBSS), 1 ml Putrescine-Stammlösung (bestehend aus einer 126 mg Putrescin-Hydrochlorid auf 100 ml HBSS, entsprechend einer Putrescin-Konzentration von 60 µM), 1 ml Penicillin/Streptomycin, 200 µl Na-Selenit-Stammlösung (1 mg Natrium-Selenit, 11.6 ml H₂O 0,3 ml dieser Lösung auf 9,7 ml HBSS ergibt die Stammlösung), 200 µl Progesterone-Stammlösung (1 mg Progesterone auf 3,2 ml Ethanol, 50 µl der ethanolischen Lösung auf 4,95 ml HBSS ergibt die Stammlösung), 200 µl Insulin-Stammlösung (100 mg Insulin auf 10 ml HCl, 0,01 N) sowie den

Wachstumsfaktoren EGF (20 ng/ml) und FGF 2 (20 ng/ml)..

Das expandierte Gewebe wird homogenisiert, z.B. mit einer Eppendorffpipette, und die Zellzahl mit einem Hemozytometer
5 bestimmt. Die Zellsuspension wird mit dem Expansionsmedium I oder II auf eine Zellzahl von ca. 300.000 Zellen/ml verdünnt. 8 ml dieser Zellsuspension (entsprechend ca. 2,5 Mill. Zellen) werden auf eine 25 cbm Flasche aufgesetzt und die Zellen mit einer Atmosphäre enthaltend 5 % CO₂ / 95 Luft bei 37° C für
10 ca. eine Woche kultiviert.

Die Zellen werden ein bis zweimal pro Woche in frisches Expansionsmedium I oder II umgesetzt, wozu die Zellen in der Flasche abgelöst und in Plastikröhrchen überführt und anschließend
15 zentrifugiert werden, der Überstand wird abgesaugt und 2 ml an der frischen Expansionslösung I oder II hinzugefügt und anschließend homogenisiert. Die homogenisierte Lösung wird in mehrere Proben, z.B. 3 bis 6 Proben, aufgeteilt, in neue Flaschen überführt und mit 8 ml der oben genannten Expansions-
20 lösung versetzt.

Die wie oben beschriebenen expandierten Progenitorzellen können zur Lagerung bei -80° tiefgefroren werden. Hierzu werden die Zellen aus der Kulturflasche mit der oben beschriebenen
25 Trypsinlösung abgelöst und die Zellsuspension mit 1000×g für zehn Minuten zentrifugiert. Das nach Abgießen des Überstandes erhaltene Pellet wird in der Expansionslösung I oder II aufgenommen und die Zellsuspension mit der entsprechenden Expansionslösung bis auf eine Zellzahl von 2 bis 4 x 10⁶ je ml
30 verdünnt. Die derart erhaltene Zellsuspension wird auf Eis zwischengelagert und anschließend 0,5 ml der Zellsuspension in ein bei -80° C vorgekühltes Einfrier Röhrchen unter Zugabe von 0,5 ml eines Einfriermediums (bestehend aus 50% fetalem Kälberserum, 20% Dimetylsulfoxid und 30% der Expansionslösung I oder II) gefüllt. Die verschlossenen Röhrchen werden in einer
35 Styroporbox bei -80° C eingefroren.

Zur Kontrolle werden die Proben am nächsten Tag oder später

aufgetaut und bei ausreichender Zellaktivität die übrigen bei -80°C eingefrorenen Proben in einfrierfeste Folie eingeschweißt in flüssigen Stickstoff überführt.

5 Zur Kontrolle der eingefrorenen Zellproben werden die aufgetauten Zellen vermehrt, differenziert und mit den oben angegebenen, vom Zelltyp abhängigen Methoden charakterisiert. Die eingefrorenen Progenitorzellen, die ausreichende Zellcharakteristika aufweisen werden gelagert und als Transplantat verwendet.

Die derart präparierten Progenitorzellen können mit unbegrenzter Dauer in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

15 Zum anschließenden Auftauen der Zellproben werden die Einfrierröhrchen direkt dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37°C vollständig aufgetaut. Anschließend wird das Röhrchen mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Die Zellsuspension in 15 ml-Plastikröhrchen überführt und mit 9 ml des
20 Expansionsmediums I oder II langsam und unter Schütteln versetzt. Die entstandene Suspension wird bei $1000\times g$ für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zell-Pellet in 6 ml Expansionsmedium I oder II aufgenommen. Die Probe wird anschließend in eine 50 ml Kulturflasche überführt
25 und in einer Atmosphäre mit 5 % CO_2 / 95 % Luft bei 37°C für ca. eine Woche inkubiert. Anschließend erfolgt die weitere Expansion der Zellen wie oben beschrieben.

Eine Differenzierung der Progenitorzellen kann mit frisch expandierten oder mit aufgetauten Proben erfolgen.

Die Zellen werden hierzu aus der Kulturflasche gespült, zentrifugiert und in einem geeigneten Aufnahmemedium aufgenommen, so daß eine Zellzahl von ca. 20.000 bis 100.000 Zellen/ml resultiert.

Nachfolgend werden beispielhaft die Zusammensetzungen dreier geeigneter Aufnahmemedien angegeben.

Das Aufnahmemedium I besteht aus 45,1 % F-12 Medium, 45,1 % DMEM, 1 ml Transferrin-Stammlösung, 1 ml Putrescin-Stammlösung (ergibt 60 μ M), 150 I. E./ml Penicillin/150 μ g/ml Streptomycin, 200 μ l Na-Selenit-Stammlösung, 200 μ l Progesterone-Stammlösung und 200 μ l Insulin-Stammlösung.

Die Zusammensetzungen der genannten Stammlösungen entsprechen den Stammlösungen der oben beschriebenen Herstellung des Expansionsmediums II..

Das Aufnahmemedium II enthält 44,5 % F-12 Medium, 44,5 % DMEM, 150 I. E./ml Penicillin/150 μ g/ml Streptomycin sowie 10% fetales Kälberserum (nicht Hitze-inaktiviert).

Das Aufnahmemedium III enthält 98 % eines Neurobasal Mediums (Firma Gibco), 1 % N-2 Supplement (Firma Gibco) sowie 150 I. E./ml Penicillin/150 μ g/ml Streptomycin.

Den das Zellmaterial enthaltenden Aufnahmemedien werden zur Differenzierung jeweils IL-1 (100 pg/ml), IL-11 (1 ng/ml), GDNF (1 μ g/ml) und LIF (1 ng/ml) zusammen oder diese Stoffe in den angegebenen Konzentrationen jeweils einzeln zugesetzt.

Die Proben werden für 7 bis 21 Tage in einer Atmosphäre mit einem Sauerstoffgehalt von 2% inkubiert.

Anschließend werden die erhaltenen Zellen durch Subklonierung in einer Atmosphäre mit 5% Sauerstoff selektioniert, worauf die oben beschriebenen Schritte der Expansion und Differenzierung wiederholt werden.

Die entstandenen Zellsuspensionen werden für Transplantationen in einer phosphat-gepufferten Salzlösung aufgenommen.

Es wurden jeweils Präparate aus dopaminergen Neuronen erhalten, die praktisch frei von glialen Zellen sind. Die Zellen können dann transplantiert werden.

LIPPERT, STACHOW, SCHMIDT & PARTNER
Patentanwälte · European Patent Attorneys · European Trademark Attorneys
P.O. Box 30 02 08, D-51412 Bergisch Gladbach
Telefon +49 (0) 22 04.92 33-0
Telefax +49 (0) 22 04.626 06

Gu/th

18. Juni 1999

5 **Horst Peschel**
51643 Gummersbach

10 **Neuronales Zellmaterial, Verwendung als Transplantat und
Verfahren zu dessen Herstellung**

Patentansprüche

- 15 1. Isoliertes neuronales Zellmaterial, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß das Zellmaterial keine phy-
siologisch wirksamen Anteile an immunokompetenten glialen
Zellen enthält.
- 20 2. Zellmaterial nach Anspruch 1, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß das Zellmaterial praktisch
ausschließlich dopaminerge Neuronen und/oder cholinerge
Neuronen und/oder GABAerge striatale und/oder serotoniner-
ge Neuronen oder Zellen enthält, die in diese Neuronen
differenzieren können.
- 25 3. Zellmaterial nach Anspruch 1, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß das Zellmaterial im wesentli-
chen aus dopaminergen Neuronen besteht oder praktisch
ausschließlich Zellen enthält, die in diese Neuronen dif-
ferenzieren können.
- 30 4. Zellmaterial nach Anspruch 1, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß das Zellmaterial im wesentli-
chen aus cholinergen Neuronen besteht oder praktisch aus-
schließlich Zellen enthält, die in diese Neuronen diffe-
renzieren können.
- 35 5. Zellmaterial nach Anspruch 1, d a d u r c h g e -

k e n n z e i c h n e t, daß das Zellmaterial im wesentlichen aus GABAergen striatalen Neuronen besteht oder praktisch ausschließlich Zellen enthält, die in diese Neuronen differenzieren können.

5

6. Zellmaterial nach Anspruch 1, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß das Zellmaterial im wesentlichen aus serotonergen Neuronen besteht oder praktisch ausschließlich Zellen enthält, die in diese Neuronen differenzieren können.

10

7. Zellmaterial nach einem der Ansprüche 1 - 6, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Zellen mammale, insbesondere humane, Zellen sind.

15

8. Zellmaterial nach Anspruch 7, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß das Zellmaterial aus Progenitorzellen gewonnen wurde.

20

9. Transplantationsfähiges neuronales Zellmaterial, daß aus Zellmaterial nach einem der Ansprüche 1 - 8 erhalten wurde.

25

10. Progenitorzelllinie aus monoklonalen mammalen, insbesondere humanen Progenitorzellen, die durch Zugabe geeigneter Differenzierungsmittel ausschließlich oder überwiegend in neuronale Zellen differenzieren.

30

11. Verfahren zur Herstellung einer wachstumsfähigen Zellkultur aus Progenitorzellen, enthaltend die folgenden Verfahrensschritte:

35

- Entnahme von Hirnteilen eines Mammals,
- Selektion von Progenitorzellen,
- Vermehrung der Progenitorzellen
- Differenzierung der Progenitorzellen zu neuronalen Zellen
- bei Bedarf ein- oder mehrmalige Wiederholung einer oder mehrere der Schritte 2 bis 4.

12. Verfahren nach Anspruch 11, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, daß die Selektion der Progenitorzellen
durch Subklonierung erfolgt, die unter einer Atmosphäre
mit vermindertem Sauerstoffgehalt durchgeführt wird oder
5 die Veränderungen simuliert, die durch einen veränderten
Sauerstoffgehalt induziert werden können.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß die Selektion der Progenitor-
10 zellen durch Priming erfolgt, das unter einer Atmosphäre
mit vermindertem Sauerstoffgehalt durchgeführt wird oder
die Veränderungen simuliert, die durch einen veränderten
Sauerstoffgehalt induziert werden können.
14. Verfahren nach Anspruch 12 und 13, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß der Selektion der Progenitor-
zellen durch Priming, die unter einer Atmosphäre mit ver-
mindertem Sauerstoffgehalt durchgeführt wird, eine Sub-
klonierung unter einer Atmosphäre mit vermindertem Sauer-
stoffgehalt oder die Veränderungen simuliert, die durch
20 einen veränderten Sauerstoffgehalt induziert werden kön-
nen, vor- und oder nachgeschaltet ist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 - 14, d a d u r c h
25 g e k e n n z e i c h n e t, daß der Sauerstoffgehalt der
Atmosphäre kleiner 10 Vol.-%, vorzugsweise kleiner 5 Vol.-%
beträgt oder Veränderungen simuliert, die durch solche
Sauerstoffgehalte induziert werden können..
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 - 15, d a d u r c h
30 g e k e n n z e i c h n e t, daß die Selektion durch
genetische Modifikation erfolgt.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 - 16, d a d u r c h
35 g e k e n n z e i c h n e t, daß die partielle Differen-
zierung durch eine Behandlung mit geeigneten Zytokinen
und/oder Wachstumsfaktoren und/oder Transkriptionsfaktoren
und/oder Neurotransmittern und/oder Hormonen und/oder

Gangliosiden in wirksamen Mengen und anschließende Inkubation unter geeigneten Bedingungen für einen ausreichend langen Zeitraum erfolgt.

- 5 18. Verfahren nach Anspruch 17, d a d u r c h g e k e n n -
z e i c h n e t, daß die Differenzierung unter Zugabe
einer oder mehrere der Wachstumsfaktoren aus der Gruppe
EGF, FGF, GDNF, TGF α und β , LIN-3-Protein, NGF, BDNF, NT,
10 CNTF, PDNF, IGF, VEGF, einschließlich deren Untergruppen
erfolgt.
- 15 19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t, daß zur Vermehrung und/oder Dif-
ferenzierung eine oder mehrere Zytokine aus der Gruppe
LIF, Interleukine (IL 1-16), TNF, Interferone, makrophage
inhibitorstimulierende Faktoren, insbesondere MIF, MSF,
Retinsäure, zugegeben werden.
- 20 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 - 19, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß zur Differenzierung ein
oder mehrere der Neurotransmitter aus der Gruppe Dopamin,
Acetylcholin, GABA, Glutamat, Glycin, Taurin, Prolin,
Noradrenalin, Serotonin, Substanz P und Ekephalin einge-
setzt werden.
- 25 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 - 20, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß zur Differenzierung der
Progenitorzellen monoklonale Progenitorzelllinien einge-
setzt werden.
- 30 22. Zellkultur, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß die Zellen nach einem Verfahren nach den Ansprüchen 17
- 21 hergestellt wurden.
- 35 23. Transplantationsfähiges neuronales Zellmaterial aus, d a -
d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß das Zell-
material aus einer wachstumsfähigen Zellkultur nach An-
spruch 22 gewonnen wird.

18. Juni 1999

5

Horst Peschel

51643 Gummersbach

10

**Monoklonale Progenitorzellen zur Therapie neurologischer
Erkrankungen**

Zusammenfassung

20

Die Erfindung betrifft ein transplantationsfähiges neuronales Zellmaterial. Um unerwünschte immunologische Nebenwirkungen zu vermeiden wird ein Zellmaterial vorgeschlagen, das keine physiologisch wirksamen Anteile an glialen Zellen enthält. Ein Verfahren zur Herstellung einer wachstumsfähigen Zellkultur aus Progenitorzellen, enthält die folgenden Verfahrensschritte: Entnahme von Hirnteilen eines Mammals, Selektion von Progenitorzellen, Vermehren der Progenitorzellklone, Differenzierung der Progenitorzellen zu spezifischen neuronalen Zellen.